

主論文の要旨

**ROR1, a target of NKX2-1/TTF-1 lineage-survival
oncogene, inhibits ASK1-mediated pro-apoptotic
signaling in lung adenocarcinoma**

肺腺がんにおける NKX2-1/TTF-1 リネジ生存癌遺伝子の標的たる
ROR1 による ASK1 を介したアポトーシス経路の抑制

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻
腫瘍病態学講座 分子腫瘍学分野

(指導：高橋 隆 教授)

井田 梨沙

【緒言】

肺がんは、我が国を始めとする先進諸国のがん死亡原因の第一位であり、末梢肺の気道上皮から発生する肺腺がんは、その中でも最も多い組織型である。我々は、これまでに正常末梢肺の発生や分化のリネジ特異的マスター調節転写因子である NXK2-1/TTF-1 遺伝子の発現持続が、肺腺がんの生存にとって必須であることを明らかにするとともに、それを担う転写活性化標的として受容体型チロシンキナーゼ ROR1 遺伝子を同定した。さらに、肺腺がんにおいて ROR1 が、キナーゼ活性依存的及び非依存的な二つの機能を通じて、PI3K-AKT 軸を介した生存シグナルの維持に関わっていること、および、その分子機序の詳細を明らかとしてきた。

本研究においては、これまで詳細が不明であった ROR1 によるアポトーシスシグナルの抑制と、その分子機序を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

我々は、ROR1 と ASK1 を共に発現している肺腺癌の細胞株、PC-9 および NCI-H1975 を用いて、ROR1 と ASK1 を同時にノックダウンしたときの影響を調べた。ROR1 の発現抑制により肺腺がん細胞の増殖は顕著に抑制されるが、ASK1 を同時にノックダウンすることによって、有意な部分的増殖抑制の回復が認められた。また、ROR1 ノックダウンによる MKK3/6 および p38 のリン酸化の上昇は、ASK を同時に発現抑制することにより有意に抑えられた。これらのことから、肺腺癌細胞での ROR1 ノックダウンによる細胞増殖の抑制に、ASK1 を介したアポトーシス経路が、少なくとも一部関与していることが示唆された (Fig.1a および 1b)。

さらに ROR1 が ASK1-p38 MAPK 経路の制御に関わっているかどうかを詳細に検討するため、我々は MSTO-211H 細胞株に空ベクター (VC) もしくは野生型 ROR1 の発現コンストラクト (ROR1-WT) を導入して定常的に発現させた細胞株を作製し、ASK1 と p38 のリン酸化を調べた。その結果、定常状態において、ROR1 発現時に ASK1 Thr845 の自己リン酸化および p38 T180/Y182 のリン酸化が有意に抑制されていた (Fig. 2a)。さらに、過酸化水素刺激条件下において、ASK1 および p38 のリン酸化を調べたところ、酸化ストレスによる ASK1 (T845) および p38 (T180/Y182) の上昇は、ROR1-WT 発現細胞において、有意な抑制が認められた (Fig. 2b)。また、AKT によってリン酸化され抑制化されることが知られる ASK1 の Ser83 のリン酸化は、過酸化水素刺激時の ROR1 発現細胞株において有意に維持されていた。次に、293T 細胞株で発現させ精製した myc-ASK1、キナーゼ活性を欠損した MBP-MKK6 の精製タンパクを用いた *in vitro* kinase assay による ROR1 の効果について検討を行った。ASK1 の自己リン酸化 (Thr845) および ASK1 による MKK6 のリン酸化 (S207) は GST-ROR1 存在下で顕著に抑制された (Fig. 3)。以上のことから、ROR1 が抑制的に ASK1-MKK3/6-p38 を介したアポトーシス経路の制御を行っていることが示唆された。

我々は、さらに ROR1 による ASK1 制御機序の詳細を明らかにするために、ASK1 と ROR1 の相互作用について検討した。293T 細胞株に ROR1 および ASK1 を共発現

させ、免疫沈降法を行い、ASK1 が ROR1 と共沈降することを、抗 ASK1 抗体および抗 ROR1 抗体を用いて確認した (Fig. 4a)。また、MSTO-211H 細胞において、定常的に発現させた ROR1 と内因性の ASK1 の結合も認められた (Fig. 4b)。さらに、様々な肺癌細胞株において、内因性の ROR1 と ASK1 の結合を確認した (Fig. 4c)。また、この結合は、過酸化水素存在下でも維持されていた (Fig. 4d)。さらに、ASK1 による ROR1 の結合領域を調べるため、ROR1 の様々な欠損変異体を作製し、COS-7 細胞株に発現させ、免疫沈降-ウェスタンブロット法により解析を行った。その結果、ROR1 と ASK1 の結合には、ROR1 の C 末端領域に存在するセリン・スレオニン領域が必要であることが明らかとなった (Fig. 5b)。

次に我々は、ROR1 のキナーゼ活性が ASK1 の抑制に必要であるかどうか検討を行った。ROR1-WT もしくは ROR1-kinase dead (ROR1-KD) を定常的に発現させた MSTO-211H 細胞株を作製し、過酸化水素で処理を行い、ウェスタンブロット法により ASK1 の活性化を解析した。過酸化水素刺激による ASK1 および p38 の活性化は、ROR1-WT によって顕著に抑制されるが、ROR1-KD では VC と同様に、抑制効果は認められなかった (Fig. 6a)。また、過酸化水素刺激による細胞増殖の低下は、ROR1-WT 発現細胞株において一部回復されたが、ROR1-KD 発現細胞株では回復されなかった (Fig. 6b)。さらに、フローサイトメトリーを用いた解析により、過酸化水素刺激によるサブ G1 期の増加は、ROR1-WT では顕著に抑えられるのに対し、ROR1-KD では抑制されないという結果が得られた (Fig. 6c)。今回の研究では、肺腺がん細胞において、ROR1 が ASK1 と結合してキナーゼ活性依存的に ASK1 の活性化を抑制し、ASK1-p38 軸が伝達するアポトーシスシグナルを負に制御していることが明らかとなった。

【考察】

我々は以前に、ROR1 が NKX2-1/TTF-1 の下流因子として、生存シグナルとアポトーシスシグナルを維持していることを報告した。今回の研究では、ROR1 が ASK1 と結合し、ASK1-p38 軸のアポトーシス経路を抑制的に制御していることが新たに明らかとなった。ROR1 の発現は、酸化ストレスによる ASK1 の活性化を、キナーゼ活性依存的に抑制した。興味深いことに、外因性の酸化ストレスを加えない定常状態においても、ROR1 の発現は ASK1 の活性化を抑制しており、ROR1 が、内因性の酸化ストレス等の刺激による ASK1 の活性化を抑制していることが示唆される。

ASK1 の活性化は、キナーゼドメインに存在する Thr845 残基の自己リン酸化および、様々なキナーゼによるリン酸化反応によって制御されている。しかしながら、ASK1 の配列上に存在する 40 のチロシン残基の中で、どの部位が ROR1 によって直接的にもしくは間接的に制御を受けるのかは、まだ明らかとなっていない。また、ASK1 は様々な因子との結合によっても制御されており、ROR1 がこれらの ASK1 結合因子やまだ未明の因子を介して、その活性化を制御している可能性も考えられる。

【結論】

ROR1 は、NKX2-1/TTF-1 が担うリネジ特異的生存シグナルを伝達する重要な下流分子であって、ROR1 の抑制は、EGFR 阻害剤に耐性の獲得に関わる EGFR T790M 変異等を有する肺腺癌細胞を含み、その生存と増殖を顕著に低下させる。したがって、ROR1 は難治がんの代表例たる肺癌における有効な治療標的になり得ると考えられている。今回の研究ではさらに、ROR1 が酸化ストレスによる ASK1 の活性化およびアポトーシスを抑制することが明らかとなった。酸化ストレスを誘導する抗がん剤に、ROR1 の抑制を併用することが、治療効果を高めることが期待される。また、近年 ROR1 が肺腺癌のみならず、他の様々ながん腫の発生・進展に関わっている可能性も報告されるとともに、ROR1 は癌細胞と胎児細胞において発現が高く、正常細胞での発現がほとんど見られない、癌胎児抗原的な性格を有することも報告されている。今後、がんにおける ROR1 の機能的な役割について、さらなる分子機序の解明を進めることにより、難治がんの革新的な分子標的治療法の開発につながることを期待される。